

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian bersifat eksperimental untuk menguji aktivitas antibakteri dengan ekstrak etil asetat buah bintaro (*Cerbera manghas* L) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Proses pengujian antibakteri menggunakan metode bioautografi dengan pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dari masing-masing komponen senyawa pada ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas* yang telah dipisahkan dengan teknik KLT.

4.2 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sintesis Fakultas Ilmu Kesehatan dan Laboratorium Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3 Alat Penelitian

4.3.1 Pembuatan Serbuk Simplisia

1. Mesin penggiling
2. Timbangan analytic balance Ohaus

4.3.2 Proses Ekstraksi

- | | |
|------------------------------------|--------------------------|
| 1. Timbangan analytic balance | 8. Oven BINDER |
| 2. Gelas ukur 1000 ml Pyrex | 9. Pipet tetes |
| 3. Labu Erlenmeyer 500 ml Pyrex | 10. Stopwatch |
| 4. Corong Buchner | 11. Sudip |
| 5. Cawan porselen | 12. Beaker glass 1000 ml |
| 6. <i>Rotary evaporator vacuum</i> | |
| 7. Batang pengaduk | |

4.3.3 Identifikasi Profil KLT

- | | |
|---------------------|-------------------------------|
| 1. Cawan porselen | 5. Pinset |
| 2. Chamber | 6. Timbangan analytic balance |
| 3. Plat KLT | 7. Lampu UV |
| 4. Pipa kapiler 5µl | 8. Vial |

4.3.4 Pengujian Bioautografi

- | | |
|---------------------|------------------|
| 1. Inkubator | 8. Pipet volume |
| 2. Autoclave | 9. Kertas saring |
| 3. Micro pipet | 10. Chamber |
| 4. Laminar Air Flow | 11. Cawan petri |
| 5. Tabung reaksi | 12. Plat KLT |
| 6. Hot Plate | 13. Jarum OSE |
| 7. Bunsen | |

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan Uji

Pada penelitian ini bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas*. Buah *Cerbera manghas* didapatkan dari Kecamatan Lowokwaru, Malang, Jawa Timur dan telah diidentifikasi oleh UPT. Balai Materia Medika, Dinas Kesehatan Jawa Timur. Penelitian ini mengambil sampel buah *Cerbera manghas* yang sudah tua, berwarna hijau.

Bakteri uji adalah *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.2 Sampel Bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* diisolasi pada media agar *Mueller Hinton* (MHA) diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.

4.4.3 Proses Ekstraksi

1. Pelarut Etil Asetat teknis PT. Panadia
2. Serbuk buah *Cerbera manghas*

4.4.4 Identifikasi Profil KLT

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------|
| 1. Etil asetat teknis | 8. Larutan KOH 10% |
| 2. <i>N</i> -heksana teknis | 9. FeCl ₃ 1% |
| 3. Reagen Dragendorff | |
| 4. Reagen Anisaldehyd-asam sulfat | |
| 5. Silica gel 60 F254 | |
| 6. Asam sulfat 10% | |
| 7. Aquadest | |

4.4.5 Pengujian Bioautografi

- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. Ekstrak etil asetat buah <i>Cerbera manghas</i> | 4. Plat KLT |
| 2. <i>Mueller Agar Hinton</i> (MHA) | 5. <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 3. Aquadest steril | 6. Etil asetat teknis |
| | 7. <i>N</i> -heksana teknis |

4.5 Sterilisasi Bahan dan Alat

Semua alat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan melalui proses sterilisasi, yaitu dengan cara sterilisasi kering dan sterilisasi basah. Alat dan bahan yang akan disterilkan antara lain yaitu, cawan petri, Erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, penjepit, spatula, *Mueller Agar Hinton* (MHA), dan seluruh alat serta bahan lain yang akan digunakan.

4.5.1 Sterilisasi Kering

Sterilisasi kering meliputi cara sterilisasi dengan api langsung dan cara sterilisasi dengan oven pemanas (Sylvia, 2008).

(1) Steriliasi dengan api langsung

Sterilisasi ini dilakukan terhadap peralatan seperti jarum ose, pinset, spatel, mulut tabung, dan batang pengaduk.

(2) Sterilisasi dengan oven pemanas

Oven pemanas digunakan untuk sterilisasi peralatan gelas yang tidak berskala seperti cawan petri, tabung reaksi dan pipet. Alat-alat yang disterilkan dimasukkan ke dalam ovens etelah mencapai suhu 160° C selama 12 jam.

4.5.2 Sterilisasi Basah

Sterilisasi digunakan dengan menggunakan autoklaf. Peralatan yang disterilkan dengan sterilisasi basah diantaranya gelas ukur, Erlenmeyer, pipet tetes, dan media agar. Proses sterilisasi ini dilakukan pada suhu 121° C selama 15-20 menit (Sylvia, 2008).

4.6 Metode Penelitian

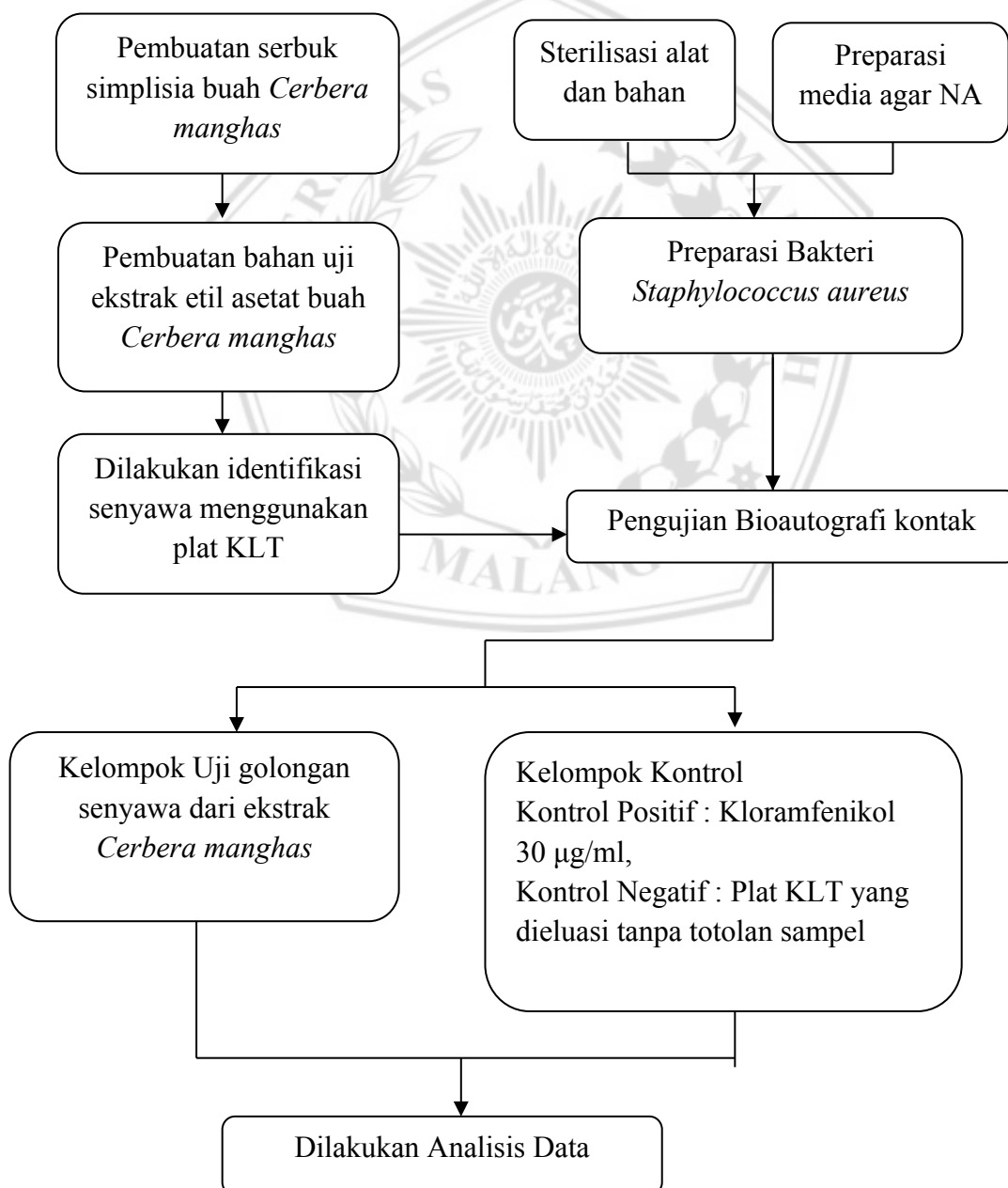
4.6.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian yang bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui daya hambat serta mengidentifikasi senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas* terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode bioautografi.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dua perlakuan, yaitu kelompok uji dan kelompok kontrol. Penelitian ini melalui beberapa tahapan, yaitu :

1. Persiapan simplisia
2. Penarikan komponen senyawa (ekstraksi)
3. Pemisahan komponen senyawa dengan metode KLT
4. Pengujian antibakteri dengan metode bioautografi.

4.6.2 Kerangka Penelitian



Gambar 4 1 Skema Kerangka Operasional

4.7 Variabel Penelitian

4.7.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah komponen senyawa yang terpisahkan dengan metode KLT dari ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas*. Kelompok Uji : komponen senyawa pada ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas* yang telah dipisahkan dengan teknik KLT terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Kelompok Kontrol : kontrol positif (kloramfenikol 30 µg/ml) dan kontrol negatif (Plat KLT yang dieluasi tanpa totolan).

4.7.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa uji yang ditandai dengan adanya daerah bening di sekitar senyawa uji yang ada pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebagai parameter untuk menentukan daya hambat minimum dari senyawa ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas*.

4.8 Definisi Operasional

1. Senyawa uji pada penelitian ini adalah senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas* yang dipisahkan dengan teknik KLT.
2. Diameter zona hambat adalah zona bening yang dihasilkan oleh aktivitas senyawa uji ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas*, dimana besarnya diameter zona bening tersebut menandakan daya hambat dari aktivitas senyawa uji ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas*.
3. Ekstrak etil asetat yang dimaksud dalam penelitian ini adalah hasil ekstraksi buah *Cerbera manghas* dari pelarut etil asetat yang berupa ekstrak kental.

4.9 Prosedur Kerja

4.9.1 Pembuatan Simplisia

Sampel yang diteliti adalah buah *Cerbera manghas*. Daging buah *Cerbera manghas* dipisahkan dari bijinya, kemudian dioven pada suhu 50°C selama 3-4 hari untuk proses pengeringan. Bagian buah *Cerbera manghas* yang telah kering kemudian dijadikan serbuk.

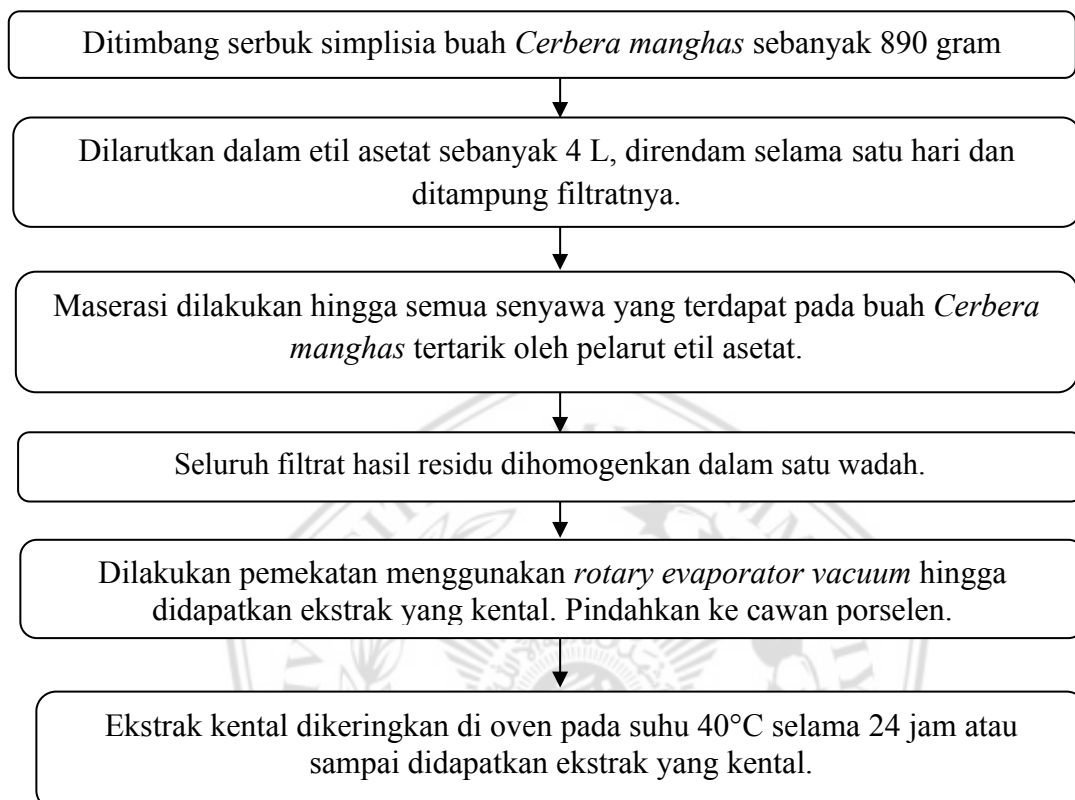
4.9.2 Pembuatan Ekstrak Bahan Uji

Pada proses ekstraksi yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah dengan metode maserasi perendaman dengan menggunakan pelarut yaitu pelarut etil asetat. Adapun prosedur kerjanya adalah sebagai berikut :

Dalam pembuatan ekstraknya digunakan serbuk buah *Cerbera manghas* sebanyak 890 gram yang diekstraksi dengan 4000 ml pelarut etil asetat dengan menggunakan maserasi perendaman selama 24 jam sebagai berikut :

1. Ditimbang serbuk halus buah *Cerbera manghas* sebanyak 890 gram menggunakan kertas perkamen, kemudian dimasukkan ke dalam toples besar.
2. Ditambahkan etil asetat sebanyak 4000 ml dan direndam selama 24 jam untuk proses pembasahan, kemudian disaring dengan corong Buchner dan tampung filtratnya (filtrat 1 dan residu 1).
3. Residu 1 dimaserasi dengan ditambahkan 2500 ml etil esetat kemudian direndam selama 24 jam. Filtrat disaring kembali dengan corong Buchner dan ditampung.
4. Maserasi dilakukan hingga semua senyawa yang terdapat pada buah *Cerbera manghas* tertarik oleh pelarut etil asetat. Hal ini ditandai dengan dilakukan tes pada plat KLT tidak ada noda yang terbentuk pada plat KLT.
5. Filtrat dikumpulkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* sampai diperoleh larutan ekstrak kental. Kemudian pindahkan ekstrak kental ke cawan porselen.
6. Ekstrak kental dikeringkan di oven pada suhu 40° C selama 24 jam atau sampai didapatkan ekstrak yang kental.

Bagan Alir Pembuatan Ekstrak Bahan Uji



Gambar 4 2 Bagan alir proses esktraksi buah *Cerbera manghas* dengan pelarut etil asetat.

4.9.3 Pemisahan Senyawa dengan KLT

Proses penelitian dengan penggunaan plat KLT dilakukan dua kali yakni untuk identifikasi senyawa metabolit sekunder dan juga untuk pengujian bioautografi. Pemilihan eluen etil asetat dan *n*-heksana memiliki alasan bahwa kedua eluen tersebut cenderung stabil dan memiliki viskositas yang rendah, selain itu kombinasi eluen tersebut memberikan selektifitas yang memadai untuk campuran bahan yang akan dipisahkan, khususnya pada penelitian ini bersifat semi polar. Eluen dipilih pada konsentrasi yang sesuai dengan sampel yang dipisahkan agar kromatografi dapat berjalan dengan baik. Pemilihan kombinasi eluen ditujukan agar tidak memberikan hasil yang bervariasi.

1. Fase diam : Silika Gel TLC 60 F254

2. Optimasi fase gerak :

(1) Heksana: EA = 8 : 2

(3) Heksana: EA = 6 : 4

(2) Heksana: EA = 7 : 3

(4) Heksana: EA = 5 : 5

4.9.4 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Terhadap komponen senyawa yang telah dipisahkan dengan metode KLT, dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas* dengan penampak noda sebagai berikut:

- 1) Alkaloid : Dragendorff (noda berwarna jingga)
- 2) Terpenoid : anisaldehida-asam sulfat dengan pemanasan (noda berwarna ungu)
- 3) Flavonoid : uap amonia atau asam sulfat 10% (noda berwarna kuning intensif)
- 4) Tanin : besi (III) klorida 1% (noda berwarna hitam)
- 5) Antrakinon: larutan kalium hidroksida 10% dalam metanol (noda berwarna jingga atau merah)

4.9.5 Preparasi Media

a) *Mueller Hinton Agar*

Dalam penelitian ini digunakan satu media yakni *Mueller Hinton Agar* (MHA). Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan melarutkan bahan sebanyak 38 gram (dengan komposisi : Beef dehydrate infusion 300g/l, *Casein hydrolysate* 17,5 g/l, *Starch* 1.5 g/l dan Agar 15 g/l) kedalam 1 L aquadest pada Erlenmeyer dengan kapasitas 1 L. Erlenmeyer tersebut diletakkan diatas hot plate kemudian masukkan *magnetic stirrer* ke dalam Erlenmeyer untuk mempercepat pelarutan sampai didapatkan larutan media menjadi berwarna kuning jernih. Setelah itu Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C. Dituang media steril ke cawan petri steril secara aseptis (Hafsan dkk., 2015).

b) *Nutrient Broth*

Media *nutrient broth* dibuat dengan melarutkan bahan *nutrient broth* sebanyak 38 gram kedalam 1 L aquadest dan dipanaskan sambil dikocok dengan menggunakan pengaduk magnetik hingga homogen. Larutan tersebut dimasukkan kedalam labu erlenmeyer dan ditutup dengan kapas dan aluminim foil kemudian di sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

4.9.6 Pembuatan Standar Mc Farland

Diambil aquadest kira-kira setengah dari tabung reaksi. Kemudian tambahkan H₂SO₄ 1% sebanyak 9950 μ L dan BaCl₂ 1% sebanyak 50 μ L. Campur kedua larutan dalam tabung tersebut, dikocok sampai homogen dan terbentuk larutan keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai suspensi bakteri dengan tingkat kekeruhan 10⁸ CFU/ml (Anonim, 2015 ; Zamora *et al*, 2012).

Tabel 4 1 Standar Mc Farland

McFarland standard no.	1.0% anhydrous BaCl ₂ (ml)	1% H ₂ SO ₄ (ml)	approximate bacterial density ($\times 10^8$) (CFU ml ⁻¹)
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3.0
2	0.2	9.8	6.0
3	0.3	9.7	9.0
4	0.4	9.6	12.0

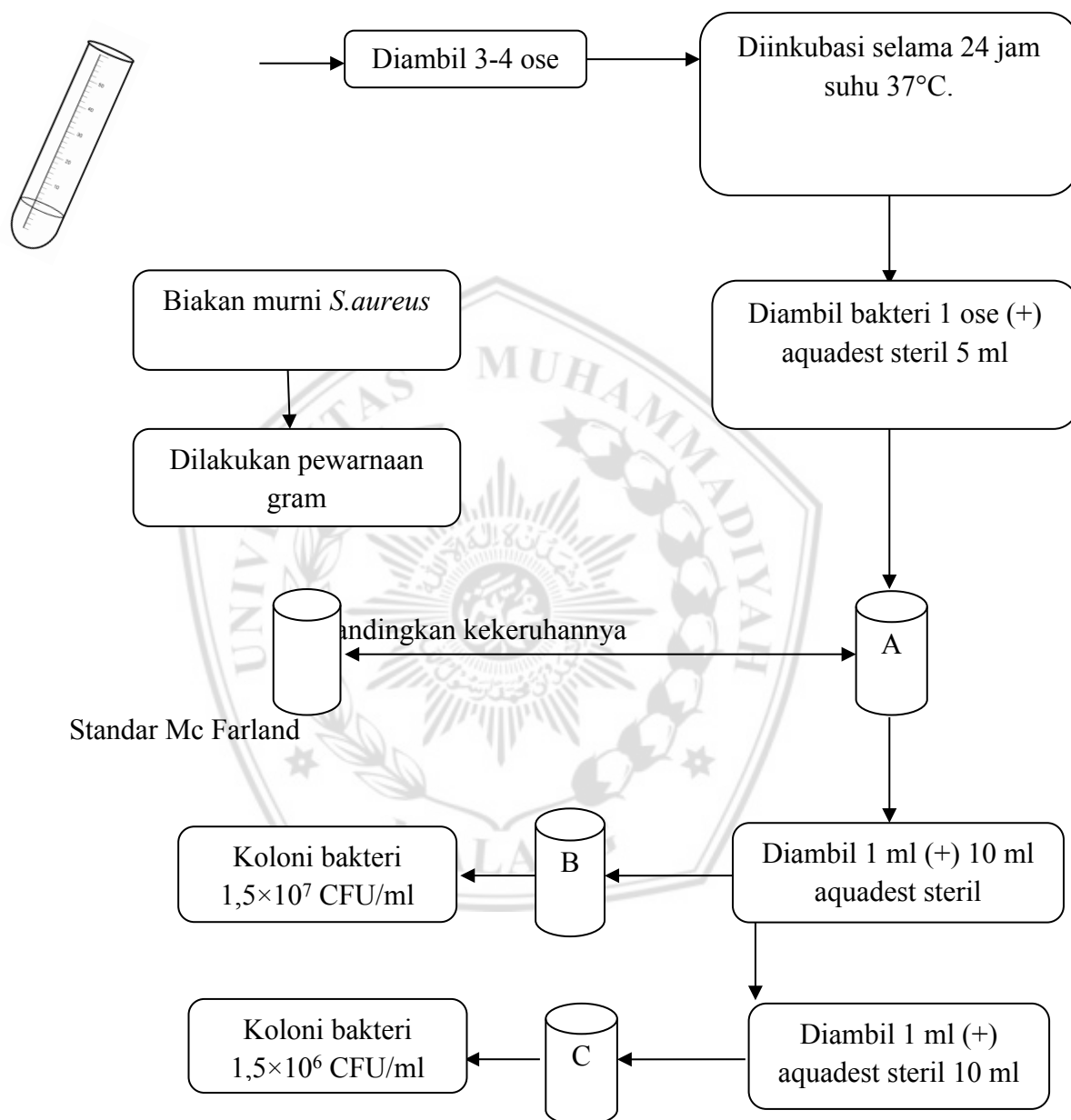
4.9.7 Preparasi Bakteri

Proses peremajaan bakteri yang berasal dari biakan murni diambil 3-4 ose kemudian dicelupkan ke dalam Erlenmeyer berisi media *Mueller Hinton Broth* (MHB). Kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Sebelum membuat suspensi bakteri, siapkan terlebih dahulu standar McFarland 0,5 yang setara dengan jumlah perkiraan suspensi bakteri yaitu 1,5 x 10⁸ CFU/ml.

Kemudian dilakukan pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*. Bakteri uji diambil dari hasil peremajaan menggunakan mikro pipet kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml aquades steril (tabung A), dikocok menggunakan vortex dan dibandingkan dengan standar McFarland 1,5 x 10⁸ CFU/ml. Jika sudah sama maka diencerkan hingga 1,5 x 10⁶ CFU (Ningsih dkk., 2013).

Pengenceran dilakukan dengan diambil 1 ml dari tabung A kemudian dilarutkan dengan Aquadest sampai 10 ml (tabung B) dengan jumlah koloni bakteri 1,5 x 10⁷ CFU/ml, kemudian diambil 1 ml dari tabung B dilarutkan dengan Aquadest sampai 10 ml (tabung C), diperoleh koloni bakteri 1,5 x 10⁶ CFU/ml. Untuk pengujian dilakukan penggoresan biakan pada media MHA di cawan petri yang diambil menggunakan kapas lidi steril kemudian digoreskan

secara merata. Lanjutkan goresan sampai habis. Setelah selesai menggores, bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Hafsan dkk., 2015).



Gambar 4 3 Bagan Preparasi Bakteri

4.9.8 Perbandingan Jumlah Koloni Dengan Mc Farland

Campuran antara bakteri *Staphylococcus aureus* dan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) pada proses peremajaan bakteri dipindahkan pada tabung reaksi. Kemudian dibandingkan dengan standar Mc Farland secara visual. Jika jumlah koloni bakteri telah sama maka bakteri yang diambil dari biakkan kemudian

dicampurkan dengan aquades lalu dioleskan secara merata pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA).

4.9.9 Pengujian Bioautografi

Prosedur pengujian secara bioautografi dilakukan sebagai berikut :

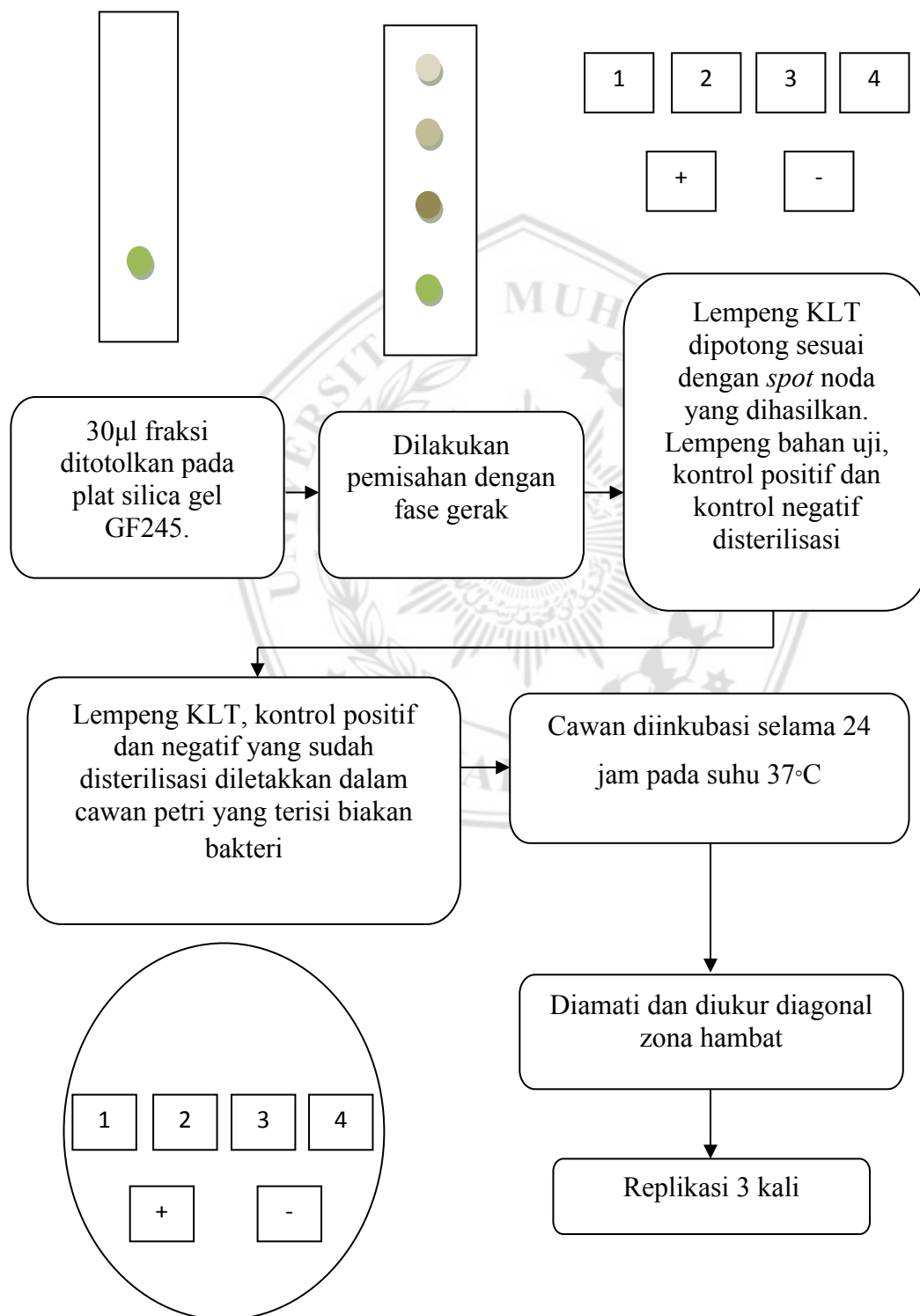
1. Ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas* ditimbang sebanyak 50 mg dan dihidrolisis, kemudian ditambahkan 5 ml etil asetat pada wadah tertutup rapat. Kemudian ditotolkan pada plat KLT sebanyak 6 kapiler (30 μ l).
2. Kemudian dikembangkan dengan fase gerak yang telah dilakukan optimasi sebelumnya sampai batas rambat, hingga dihasilkan beberapa *spot* noda.
3. Noda yang timbul diamati di bawah sinar UV 365 nm. Kemudian lempeng KLT dipotong sesuai *spot* noda yang dihasilkan dan diletakkan dalam cawan petri kosong untuk disterilisasi selama 30 menit menggunakan sinar UV di dalam LAF (*Laminar Air Flow*).
4. Lempeng KLT yang sudah disterilisasi, diletakkan di dalam cawan petri yang telah berisi biakkan bakteri sambil ditekan-tekan perlahan pada media, agar senyawa aktif dari ekstrak dapat berdifusi ke dalam media bakteri. Pada satu cawan, berisi 3 noda yang diuji, kontrol negatif dan kontrol positif.
5. Lempeng KLT dan media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk mendifusikan senyawa ke dalam media.
6. Media yang telah diinkubasi selama 24 jam dikeluarkan dari inkubator dan plat KLT dilepas dari media, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Pengujian antibakteri direplikasi sebanyak tiga kali.
7. Kloramfenikol 30 μ g/ml sebagai kontrol positif, juga diberi perlakuan yang sama, yaitu direplikasi sebanyak tiga kali.
8. Plat KLT tanpa totolan bahan uji sebagai kontrol negatif juga diberi perlakuan yang sama dan direplikasi sebanyak tiga kali.
9. Adanya aktivitas antibakteri dari senyawa metabolit sekunder dapat dilihat dengan adanya daerah bening pada media yang kemudian dihitung diagonal zona hambatnya.

4.9.10 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan melakukan pengamatan dan pengukuran diagonal zona hambat dari daerah berwarna bening dari masing-

masing komponen senyawa pada ekstrak etil asetat buah *Cerbera manghas* yang telah dipisahkan dengan teknik KLT.

Pengujian Bioautografi



Gambar 4 4 Bagan Prosedur Pengujian Bioautografi